ANNALE

UNIVERSITEIT VAN STELLENBOSCH

VOLUME 36 SERIE A NO. 4 (1961)

DIE VERBAND TUSSEN DIE FUNKSIONELE AKTIWITEIT VAN DIE ALFA-SELLE IN DIE PANKREAS-EILANDWEEFSEL EN DIE KOOLHIDRAATMETABOLISME

deur

A. C. ESTERHUIZEN, D.Sc.

en

J. de V. LOCHNER, M.Sc.

Ann. Univ. Stell. Vol. 36, Ser. A, No. 4 (1961)

DIE VERBAND TUSSEN DIE FUNKSIONELE AKTIWITEIT VAN DIE ALFA-SELLE IN DIE PANKREAS-EILANDWEEFSEL EN DIE KOOLHIDRAATMETABOLISME

deur

A. C. ESTERHUIZEN, D.Sc.

en

J. de V. LOCHNER, M.Sc.

Departement van Fisiologie,
Universiteit van Stellenbosch.

Met 14 illustrasies

ABSTRACT

The present investigation was undertaken to elucidate the conflicting reports concerning the function of the alpha cells of the pancreatic islet tissue in the regulation of carbohydrate metabolism.

The influence of an alhpa cell-damaging agent, $CoCl_2$, was investigated on (i) the histology of the islet tissue, (ii) the blood sugar concentration, and (ii) the relative, quantitative relationship (ratio) between the glycaemic protein components in the islet tissue. Special attention was given to the hyperglycaemic factor, probably secreted by the alpha cells.

Variations in the blood sugar concentration of experimental animals after administration of $CoCl_2$, was taken as an indication of the role of the alpha cells in carbohydrate metabolism.

The isolation of the glycaemic factors from pancreatic extracts and the determination of their ratio were carried out by means of paper electrophoresis.

From the results obtained, it is inferred that the alpha cells, by secreting a hyperglycaemic factor, must be considered a vital factor in the complex regulation of carbohydrate metabolism.

INHOUDSOPGAWE

VOORWOORD

Hiermee ons besondere dank aan prof. H. E. Brink van die Fisiologie-departement vir sy leiding en belangstelling, asook aan die W.N.N.R. vir die finansiële steun wat hierdie ondersoek moontlik gemaak het.

INLEIDING

LITERATUUROORSIG

Reeds in 1893 het Laguesse beweer dat die oorsake van diabetes mellitus — 'n sindroom gekenmerk deur steuringe in die normale metabolisme — primêr gesetel is in die abnormale funksionering van die eilandweefsel van Langerhans. Sedertdien het die besondere belang van die eilandweefsel in die normale metabolisme, algaande duideliker uit kliniese en eksperimentele bevindinge geblyk.

So is byvoorbeeld vasgestel dat die eksperimentele vernietiging van die insulien-sekreterende beta-selle in die eilandweefsel deur middel van alloksaan, sogenoemde „alloksaan-diabetes", 'n sindroom analoog aan diabetes mellitus, tot gevolg het (Dunn en McLetchie — 1943). Daarenteen verdwyn die diabetes-simptome by sulke proefdiere wanneer die hipoglusemie-verwekkende pankreas-hormoon, insulien, gereeld toegedien word (Lukens — 1948).

Aangaande die spesifieke funksie van die tweede selsoort in die eilandweefsel, nl. die alfa-selle, kon nog geensins eenstemmigheid bereik word nie. Die feit dat ekstrakte van die eilandweefsel nie alleen die hipoglusemiese beta-sel-hormoon, insulien, bevat nie, maar ook 'n hiperglusemiese-glikogenolitiese faktor („HGF" of „glukagon"), het navorsers reeds in die twintigerjare op die idee gebring dat ook laasgenoemde faktor sy oorsprong in die eilandweefsel het (Kimball en Murlin — 1923; Fisher — 1923). Hoewel dié faktor sedertdien na bewering uit 'n verskeidenheid van liggaamsweefsels geïsoleer kon word, wil dit tog uit die literatuur voorkom of dit vandag vry algemeen aanvaar kan word dat die alfa-selle eintlik die hoofbron van glukagon (HGF) in die liggaam moet wees.

Sedert Kimball en Murlin (1923) gepotuleer het dat glukagon 'n hormoon is, het verskeie ondersoekers hul dit ten doel gestel om die rol daarvan in die liggaamshuishouding vas te stel. Uit die groot aantal navorsingspublikasies blyk dit duidelik dat hierdie stof 'n besondere invloed op die koolhidraatmetabolisme uitoefen. Ondanks die feit dat Cavellaro (1953), Haugaard en Haugaard (1954), Pincus en Snedecor (1956) en andere meen dat dit moontlik ook 'n direkte invloed op die proteïen- en vetmetabolisme, asook op andere liggaamsreaksies uitoefen, is hierdie aspekte nog nie so volledig ondersoek as die invloed daarvan op die koolhidraatmetabolisme nie.

Alhoewel Bürger en Kramer reeds in 1929 beweer het dat glukagon lewerglikogeen direk beïnvloed, het navorsers soos Costa et al (1956), Agid en Mialhe (1957), Cahill en sy medewerkers (1957) en andere eers hierdie waarnemings eksperimenteel bevestig. Benewens die feit dat glukagon die vorming van lewerglikogeen uit glukose inhibeer (Root — 1956; Costa, Galansino en Foà — 1956; Berthet et al — 1956 en Kalant — 1956), het dit ook 'n stimulerende uitwerking op die omsetting van lewerdefosforilase tot lewerfosforilase en bring dit sodoende glikogenolise, met daaropvolgende hiperglusemie, teweeg (Sutherland en Cori — 1951; Rall, Sutherland en Berthet — 1957).

Op grond van die feit dat glukagon lewerglikogenolise teweegbring, in teenstelling met die glikogenetiese uitwerking van insulien, wil dit voorkom of daar in die normale liggaam 'n fisiologiese ewewig tussen hierdie twee faktore móét heers, ten einde 'n optimale bloedsuikerkonsentrasie te verseker. Fodden en Read (1954) is dan ook die mening toegedaan dat die bloedsuikerkonsentrasie die resultant is

van die wederkerige uitwerking van insulien, wat hipoglusemie teweegbring, en die hiperglusemiese-glikogenolitiese faktor, glukagon. Nou kan dit reeds as 'n voldonge feit aanvaar word dat enige versteuring van so 'n hormonale ewewig, metaboliese afwykinge tot gevolg sal hê. Hierdie besondere geval blyk dan geen uitsondering te wees nie, want volgens Gonzalez (1952) sou die simptomatiese verskille tussen pankreas- en alloksaan-diabetes op grond van 'n soortgelyke wanbalans verklaar kan word. Sodanige wanmetabolisme sou dan baie duidelik in die bloedsuikerkonsentrasie weerspieël word.

Uit laasgenoemde voorbeeld blyk dit verder ook duidelik dat sulke metaboliese afwykinge ook eksperimenteel bewerkstellig kan word, ten einde meer aangaande die betrokke funksionerende komponente te wete te kom. Vir hierdie eksperimentele benadering wend navorsers hul vandag taamlik algemeen tot óf vernietiging, óf gedeeltelike beskadiging van een of albei van die betrokke sekreterende selsoorte. In hierdie verband blyk dit uit die literatuur dat vernietiging van die beta-selle met alloksaan teweeggebring kan word (Dunn en McLetchie — 1943), terwyl chemikalieë soos Sintalien A* (Davis — 1952), IPTD** (Von Holt et al — 1955) of $CoCl_2$ (Van Campenhout en Cornelis — 1951) na bewering die vermoë tot alfa-sel-beskadiging besit.

---

* Dekametileen-diguanidien-hidrochloried.

** p-aminobenzol-sulfonamido-isopropieltiodiasol.

DIE DOEL VAN HIERDIE ONDERSOEK

Uit die literatuuroorsig blyk dit dat daar nog geensins eenstemmigheid bestaan oor verskeie aspekte van die rol van die alfa-selle in die liggaamshuishouding nie. So byvoorbeeld kon dit nog nie onomwonde bewys word dat dié selle die bron van die hiperglusemiese-glikogenolitiese faktor (HGF) is nie, of dat hulle onder andere wel 'n regulerende rol in koolhidraatmetabolisme speel nie.

Hierdie navorsingsprojek is dus onderneem ten einde meer lig op bogenoemde onsekerhede te werp, en daar is van die volgende veronderstellings af uitgegaan:

Indien die alfa-selle onder normale omstandighede 'n hiperglusemiese-glikogenolitiese faktor afskei, moet daar tydens 'n versteuring van hul sekretoriese aktiwiteit, veroorsaak deur alfa-sel-beskadiging, veranderinge in die bloedglukosekonsentrasie optree. Aangesien die bloedsuikerspieël weer 'n weerspieëling is van die verloop van die fisiologiese prosesse betrokke by metabolisme van koolhidrate, sou enige verandering van dié aard dus 'n aanduiding wees van die rol van die alfa-selle in die koolhidraatmetabolisme. Verder kan dit ook verwag word dat die relatiewe hoeveelheid HGF tot insulien in die eilandweefsel ná sodanige eksperimentele ingryping, versteur sal word.

Op grond van hierdie moontlike veranderinge wat mag optree ná alfa-sel-beskadiging met 'n verbinding soos $CoCl_2$, is dié projek uit die volgende gesigspunte benader:

1. Die invloed van $CoCl_2$ op die histologie van die pankreas-eilandweefsel.
2. Die invloed van $CoCl_2$ op die perifere bloedglukosekonsentrasie, soos bepaal op verskillende tye na die inspuiting.
3. Die invloed van $CoCl_2$ op die relatiewe hoeveelheid hiperglusemiese faktor tot insulien in die eilandweefsel, soos bepaal op verskillende tye ná die inspuiting.

MATERIAAL EN TEGNIEK

DIE PROEFDIERE EN HUL BEHANDELING

Die eksperimentele werk is uitgevoer met jong albino-rotte, Rattus norvegicus — Wistar Instituut, wat in die teelhokke van die Fisiologie-departement van die Universiteit van Stellenbosch, geteel is. Die proefdiere was gehuisves in standaard-proefhokke in 'n spesiale proefdierkamer, waarvan die temperatuur betreklik konstant was. Hulle dieet het bestaan uit 'n rantsoen van gebalanseerde voedingstowwe, opgemaak deur die firma, Nasionale Voedingstowwe („Nasfeeds"). Kos en lopende water was te alle tye aan die proefdiere beskikbaar.

EKSPERIMENTELE PROSEDURE

In Eksperimente 1, 2 en 4 is die „beskadiging" van die alfa-selle teweeggebring deur toediening van 'n suiwer $CoCl_2$-oplossing, in 'n dosis van 25 mg./Kg. liggaamsgewig. Die inspuitings is intra-peritoneaal onder aseptiese omstandighede toegedien. Afgesien van die alfa-selbeskadigende uitwerking van $CoCl_2$, het dit ook 'n baie uitgesproke toksiese invloed op die proefdier, sodat die sterftesyfer baie hoog sou wees. Esterhuizen (1959) het egter vasgestel dat genoemde bykomende uitwerking van $CoCl_2$ grotendeels uitgeskakel kan word deur die voorafgaande toediening van niasienamied. Daar is dus by elke rot in eksperimente 2, 3 en 4, 5 minute voor die $CoCl_2$-inspuiting, 'n niasienamiedoplossing in 'n dosis van 750 mg./Kg. liggaamsgewig, intraperitoneaal toegedien. Die proefdiere van Eksperiment 1 is in twee groepe van 14 elk verdeel. Slegs die lede van groep B het vooraf 'n niasienamied-inspuiting gekry.

EKSPERIMENT 1.

Sewe van die rotte van groep A en drie uit groep B het op verskillende tye na $CoCl_2$-toediening gevrek. Die oorblywende proefdiere is gedood soos in tabel I aangegee. Die pankreasse is in elke geval

TABEL I

GROEP A. $CoCl_2$ (25 mg./Kg.)			GROEP B. Niasienamied (750 mg./Kg.) $CoCl_2$ (25 mg./Kg.)		
Rot No.		**Dood.**	**Rot No.**		**Dood.**
1 —	Gevrek	7 min.	15 —	Gevrek	10 min.
2 —	„	12 „	16 —	„	14 „
3 —	„	24 „	17 —	„	19 „
4 —	„	27 „	18 —	Gedood	30 „
5 —	„	± 1 uur	19 —	„	30 „
6 —	Gedood	1 „	20 —	„	1 uur
7 —	Gevrek	± 4½ „	21 —	„	1 „
8 —	Gedood	4½ „	22 —	„	4½ „
9 —	Gevrek	± 1 dag	23 —	„	4½ „
10 —	Gedood	1 „	24 —	„	1 dag
11 —	„	3 dae	25 —	„	1 „
12 —	„	3 „	26 —	„	3 dae
13 —	„	3 wke.	27 —	„	3 „
14 —	„	3 „	28 —	„	3 wke.

onmiddellik na die dood verwyder en in Bouin-vloeistof vir 10-12 uur gefikseer. Daarna is dit vir 8 uur in lopende kraanwater gewas, in piridien ontwater, in benseen opgehelder (Bänder, 1952) en in paraffienwas met smeltpunt 50-52°C ingebed. Uit elke blok is sowat 150 snitte van 3 μ elk gesny, waarvan sommige volgens Gomori (1939) se modifikasie van die Mallory-Heidenhain-azan-kleurmetode gekleur is en die ander volgens die chroomhematoksilien-floksien-metode (Gomori, 1941).

EKSPERIMENT 2:

Die invloed van alfa-sel-beskadiging met $CoCl_2$, op die perifere bloedglukosekonsentrasie van nie-vastende rotte is in hierdie eksperiment bepaal.

Op vasgestelde tye ná die inspuiting, nl. 20 minute, 30 minute, 6 uur, 16 uur, 1 dag, 2 dae en 6 dae, is bloedmonsters by die stertpunte van die proefdiere onder nembutal-anestese, onttrek. Minstens vyf rotte is na elk van die genoemde periodes ondersoek. In alle gevalle is die bloedmonsters in duplikaat verkry en die bepaling met een van hierdie monsters volgens die Folin-Wu-mikrometode en met die ander volgens die metode van Asatoor en King (1954) gedoen. (Aangesien eersgenoemde metode alle reduserende substanse in die bloed aandui, is die Asatoor-King-metode, wat net die bloedglukose bepaal, eintlik as 'n „kontrole" gebruik. Hierdeur is verseker dat wisselinge in reduserende stowwe, anders as glukose, nie as glukose-veranderinge geïnterpreteer sou word nie.) Die kleurintensiteit van die finale oplossing is bepaal met 'n „Medico"-kolorimeter (Model IV), wat vooraf teenoor standaardoplossings van suiwer dekstrose gestandaardiseer is.

EKSPERIMENT 3:

Alvorens die invloed van alfa-sel-beskadiging op die relatiewe hoeveelheid van die glusemiese faktore in die pankreas-eilandweefsel bepaal kon word, moes dié faktore eers kwantitatief uit normale pankreasse geïsoleer en geïdentifiseer word.

Eksperiment 3(a):

Vir hierdie doel is die pankreasse uit normale proefdiere, onder nembutal-anestese, verwyder en ekstrakte van dié pankreasse berei volgens 'n modifikasie van die metodes van Best, Haist en Ridout (1939) en Sutherland en De Duve (1948).

Die pankreas-ekstrakte is vervolgens aan horisontale papierstrook-elektroforese onderwerp volgens die tegniek van Vesselinovitch en Funnell (1954). Aangesien die glusemiese faktore uit die pankreaseilandweefsel albei proteïene is, is die broomfenolblou-reagens van Durrum (1950) gebruik om die proteïenfraksies op die papierstroke te kleur.

Eksperiment 3(b):

Om vas te stel watter fraksies op die elektroforetogramme, die glusemiese faktore verteenwoordig, moes hul eerstens in genoegsame hoeveelhede uit ekstrakte geïsoleer word, sodat hul farmakologiese uitwerking in die tweede plek vasgestel kon word. Omdat daar met

behulp van bogenoemde metode net baie klein hoeveelhede van die ekstrakte in hul komponente geskei kon word, is die proses van „aaneenlopende elektroforese", waar soveel as 15 ml. van 'n preparaat tydens één skeiding aangewend kan word, toegepas. 'n „Elphor Va"-apparaat, waar die fraksies op 'n vertikale filtreerpapiergordyn van mekaar geskei en afsonderlik opgevang word, is vir hierdie doel gebruik. Dit kon aangetoon word dat die barbituraatbuffer wat gebruik is, hipoglusemie veroorsaak wanneer dit alleen by proefdiere ingespuit word. Om te verhoed dat die farmakologiese uitwerking van die buffer, dié van die fraksies sou „masker", is enige kontaminerende buffer uit die geskeide fraksies verwyder deur hulle vir twee dae aan 'n vakuum bloot te stel en dan aan te suur, sodat die buffersoute kon neerslaan.

Eksperiment 3(c):

Die pH van die afsonderlike fraksies is na ± 7 verskuif, deur die byvoeging van 'n gekonsentreerde ammoniakoplossing, en hul farmakologiese aktiwiteit bepaal deur die toediening daarvan by katte.

Die ingewande van die proefdiere is onder nembutal-anestese blootgelê, in 'n warm, klam handdoek toegepak en die preparate intraveneus toegedien, nadat die vena pancreatico-duodenalis afgebind is. Op vasgestelde tye ná die inspuiting is bloedmonsters uit die blootgelegde vena femoralis onttrek en die bloedsuikerkonsentrasie van elke monster in duplikaat bepaal volgens die Folin-Wu-mikrometode.

EKSPERIMENT 4:

Nadat dit uit Eksperiment 3(c) duidelik geblyk het watter fraksies op die elektroforetogramme, insulien en die hiperglusemiese faktor onderskeidelik verteenwoordig, kon die kwantitatiewe verhouding tussen hierdie fraksies onder normale omstandighede, vasgestel word. (Daar dien op gelet te word dat net die *relatiewe,* kwantitatiewe verhouding hier ter sprake is en nie die *absolute,* kwantitatiewe verhouding nie.)

Vir die kontrole-eksperiment is die fraksies op die gekleurde papierstroke uit Eksperiment 3(a) uitgeknip sodat die totale papieroppervlakte in elke geval 25cm.^{2} beslaan het. Die gekleurde materiaal is dan met 6 ml. O.1N NaOH-oplossing onttrek ("elute") en die kleurintensiteit van die resulterende gekleurde oplossing binne 1 uur in 'n „Hilger Spekker"-absorpsiometer bepaal. Dié lesings is in elke geval van 100 afgetrek en die waarde sodoende verkry, aanvaar as 'n kwantitatiewe numeriese aanduiding van die betrokke proteïenfraksie. Die rekenkundige verhouding tussen die glusemiese faktore op elke elektroforetogram is dan as 'n persentasie uitgedruk.

Met die kwantitatiewe verhouding tussen die glusemiese faktore onder normale omstandighede bekend, kon in die laaste instansie vasgestel word wat die invloed van $CoCl_2$ op hierdie verhouding is.

$CoCl_2$ is toegedien soos in Eksperimente 1 en 2 en die pankreasse onder nembutal-anestese verwyder op 30 minute, 2 uur, 4 uur, 20 uur, 2 dae en 6 dae ná die inspuiting. Na verloop van elk van hierdie periodes, is minstens vier behandelde rotte gepankreatektomeer, die pankreasse bymekaar gesit en die glusemiese faktore daaruit geëkstraheer soos in Eksperiment 3(a). Die kwantitatiewe verhouding is dan bepaal volgens die metode in Eksperiment 3(c).

RESULTATE

EKSPERIMENT 1: Die invloed van $CoCl_2$ op die histologie van die pankreas-eilandweefsel.

Intraperitoneale inspuiting van $CoCl_2$-oplossing het uitgesproke veranderinge in die eilandweefsel van die proefdiere veroorsaak. Dit is egter opvallend dat die veranderinge beperk was tot sommige van die eilandjies, terwyl ander oënskynlik nie in die minste deur $CoCl_2$ beïnvloed word nie. Die ondersoek het ook duidelik getoon dat niasienamied geensins die uitwerking van $CoCl_2$ op die eilandweefsel ophef nie.

Op grond van die opvallende verskille in die voorkoms van die eilandweefsel op bepaalde tye na die inspuiting, kan die volgende fases in die beskadigingsproses onderskei word:—

Fase I word reeds op 10 minute na die inspuiting waargeneem en word veral gekenmerk deur 'n uitgesproke polarisasie van die granules in sommige van die alfa-selle (Fig. 2). Na 27 minute is die polarisasie baie uitgesproke (Fig. 3) en kan ook 'n verandering in die alfa-selkerne waargeneem word. Sodanige verandering bestaan daaruit dat die betrokke kerne groter as normaal is en 'n neiging tot vakuolisasie vertoon.

Fase II. Op een uur na die inspuiting is die polarisasietoestand totaal opgehef en kan 'n opvallende degranulasie in sommige van die alfa-selle waargeneem word, terwyl andere 'n volkome hidropiese vakuolisasie vertoon. In figuur 4 word normale alfa-selle, enkele selle wat degranulasie vertoon, asook een sel met totale vervloeiing van die sitoplasma in een en dieselfde eilandjie aangetoon. Hieruit is dit duidelik dat die verskillende alfa-selle nie almal tot dieselfde mate deur $CoCl_2$ beinvloed word nie.

Fase III strek vanaf 4½ uur en word in die eerste instansie gekenmerk deur 'n degranulasie-toestand, wat in sommige van die alfa-selle bly voortbestaan tot op 1 dag. Die betrokke selle is opvallend groter as normaal. Tweedens kan ook veranderinge, soos hiperchromasie (Fig. 5) en kariorrheksis (Fig. 6), in enkele van die alfa-sel-kerne waargeneem word. Die belangrikste waarneming tydens hierdie fase het betrekking op die beta-selle van die eilandweefsel: By sommige van hierdie selle kan 'n vermindering van hulle spesifieke granules waargeneem word (Fig. 5), terwyl andere 'n uitgesproke hiperchromasie van die kerne vertoon (Fig. 7).

Fase IV neem 'n aanvang op 3 dae en word gekenmerk deur neogenese van eilandweefsel uit die sentro-acinêre selle. Regenerasie van die beskadigde alfa-selle geskied oënskynlik volkome, sodat geen beskadigde alfa-sel op 3 dae na $CoCl_2$-inspuiting onderskei kon word nie. Hierteenoor is beta-selle met piknotiese kerne op dieselfde tydstip baie opvallend (Fig. 8).

EKSPERIMENT 2: Die invloed van $CoCl_2$ op die perifere bloedsuikerkonsentrasie.

By die kontrole-diere is die gemiddelde waardes van 114 mg. persent (Folin-Wu) en 86 mg. persent (Asatoor-King) verkry.

Intraperitoneale inspuiting van $CoCl_2$ het 'n aansienlike invloed op die perifere bloedsuikerkonsentrasie uitgeoefen. Hierdie invloed word

openbaar as 'n trifasiese reaksie, bestaande uit 'n primêre hiperglusemie, opgevolg deur 'n verbygaande hipoglusemie, wat oorgaan in 'n tweede of sekondêre hiperglusemie (Fig. 9).

Die hoogtepunt van die primêre hiperglusemiese fase is 25 minute na die $CoCl_2$-toediening, met die gemiddelde waardes van 170 (Folin-Wu) en 135 mg.% (Asatoor-King) bereik. Na verloop van 6 uur het die bloedglukosekonsentrasie weer tot naasteby die normale waardes teruggekeer, te wete 121 (Folin-Wu) en 92 mg.% (Asatoor-King). Hierdie daling duur egter voort en bereik na 20 uur 'n laagtepunt met die gemiddelde, relatiewe hipoglusemiese waardes van 100 (Folin-Wu) en 73 mg.% (Asatoor-King).

Hierna het die bloedsuikerkonsentrasie weer 'n opwaartse neiging getoon en het op die tweede dag na die inspuiting 'n sekondêre, relatiewe hiperglusemiese waarde bereik. Hierdie fase is egter baie minder uitgesproke as die primêre hiperglusemie, soos blyk uit die onderskeie waardes van 134 (Folin-Wu) en 90 mg.% (Asatoor-King).

'n Geleidelike daling van die bloedsuikerkonsentrasie het die sekondêre hiperglusemie opgevolg, soos blyk uit die bepalings wat op die sesde dag ná die $CoCl_2$-toediening uitgevoer is. Die gemiddelde waardes op hierdie stadium was 114 mg.% (Folin-Wu), wat presies ooreenstem met die gemiddelde normale waarde, en 80 mg.% (Asatoor-King) wat ietwat laer as die gemiddelde normale waarde lê. By 'n vergelyking van laasgenoemde waardes met dié van die kontrole, blyk dit egter dat die hoogste waardes, op 6 dae ná die inspuiting verkry, laer is as die hoogste waardes wat deur die kontrole-diere gegee is.

EKSPERIMENT 3(a): Die papierstrook-elektroforetiese ondersoek van pankreas-ekstrakte.

Deur gebruik te maak van Whatman No. 1-filtreerpapierstroke en 'n barbituraatbuffer (pH 8.6; ioonsterkte = 0.10) by 'n spanning van 400 volts (stroomsterkte = 10mA) is elektroforetogramme verkry, waarop drie proteïenfraksies ná 3 uur onderskei kon word (Fig. 10).

Die stadigste fraksie A het deurgaans 7 cm. afgelê, terwyl die mees opvallende fraksie C, ± 8 cm. beweeg het. Die vinnigste fraksie D het altyd 15 cm. in dieselfde tyd migreer en was verreweg die kleinste komponent.

EKSPERIMENT 3(b): Die isolering van die proteïenkomponente uit pankreasekstrakte deur middel van aaneenlopende elektroforese:

'n Barbituraatbuffer van pH 8.6 en ioonsterkte = 0.075 is by 'n spanning van 400 volts (stroomsterkte = 10 mA) aangewend om die ekstrak van normale pankreasse op 'n Schleicher en Schüll 2040a-filtreerpapiergordyn in sy komponente te skei.

In Fig. 11 word 'n afbeelding van so 'n elektroforetogram waarop oënskynlik vier proteïenfraksies onderskei kan word, weergegee. Terwyl fraksie A effens in die rigting van die anode en fraksie C in dieselfde mate na die katode uitgewyk het, het fraksie B tussen hierdie twee fraksies te lê gekom. Daarenteen het die dofste komponent D tot 'n aansienlike mate na die katode uitbeweeg.

As 'n kontrole vir hierdie eksperiment is 'n kommersiële insulienpreparaat, wat ook minimale hoeveelhede glukagon bevat het, op dieselfde wyse ondersoek. Fig. 12 toon duidelik dat die hoofkom-

ponent 1 (insulien) na die anode uitgewyk het, terwyl die subkomponent 2 (glukagon?) in dieselfde mate in die rigting van die katode beweeg het.

By 'n vergelyking van figure 11 en 12 blyk dit dat die relatiewe posisies van fraksies 1 en 2 in laasgenoemde presies ooreenstem met dié van fraksies A en D (Fig. 11) respektiewelik. Hierdie waarneming dui dus op die moontlikheid dat laasgenoemde twee fraksies uit die ekstrak die glusemiese faktore verteenwoordig.

In hierdie verband is dit ook noodsaaklik om die relatiewe posisies van die fraksies in Fig. 10 met dié in Fig. 11 te vergelyk. Hoewel fraksies A en C van eersgenoemde nie mekaar in só 'n mate oorvleuel dat 'n derde „skynfraksie" (B) gevorm word soos in Fig. 11 nie, móét daar tog op gelet word dat dié fraksies nie baie duidelik van mekaar geskei kon word nie. Ten spyte van hierdie feit is dit tog duidelik dat die relatiewe posisies van fraksies A, C en D in Fig. 10 presies ooreenstem met dieselfde komponente in Fig. 11.

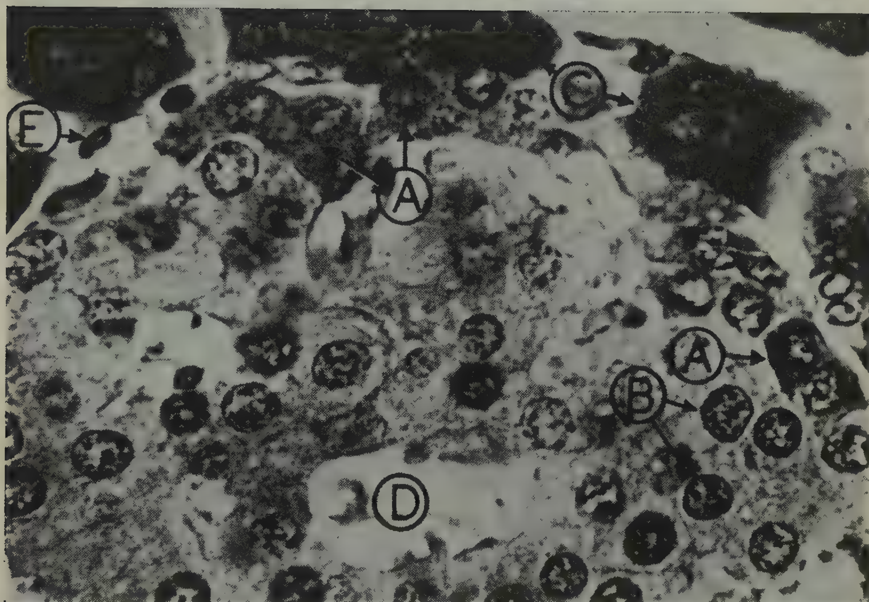
EKSPERIMENT 3(c): Die farmakologiese aktiwiteit van die proteïenkomponente van pankreasekstrakte:

By 'n ondersoek na die farmakologiese aktiwiteit van die vier fraksies uit die ekstrak is die vermoede, dat fraksies A en D glusemiese faktore is, dan ook bevestig. Uit Fig. 13 is dit duidelik dat fraksie A, hipoglusemie en fraksie D, hiperglusemie kon teweegbring. Daarenteen het fraksie C geen invloed op die bloedsuikerkonsentrasie gehad nie en moet dit dus as 'n nie-spesifieke onsuiwerheid in die ekstrak beskou word. Fraksie B het 'n onbeduidende verlaging van die bloedsuikerspieël teweeggebring en dit wil voorkom asof dié fraksie die resultant van 'n oorvleueling van fraksies A en C is en gevolglik nie as 'n afsonderlike entiteit beskou moet word nie.

EKSPERIMENT 4: Die invloed van $CoCl_2$ op die kwantitatiewe verhouding tussen die glusemiese faktore in die eilandweefsel:

Uit eksperiment 3 het dit geblyk dat fraksies A en D uit pankreas-ekstrakte, insulien en 'n hiperglusemiese faktor (glukagon?) onderskeidelik verteenwoordig. By 'n ondersoek na die invloed van $CoCl_2$ op die kwantitatiewe verhouding van hierdie twee komponente, is die probleem egter ondervind dat die insulien-fraksie (A) met die toegepaste metode (Eksp. 3(a)) nie deurgaans kwantitatief van die nie-spesifieke onsuiwerhede (fraksie C — Fig. 10) geskei kon word nie. In hierdie eksperiment is die kwatitatiewe verhouding tussen fraksie D en die A-C-kompleks dus bepaal en die invloed van $CoCl_2$ op hierdie verhouding ondersoek. Desnieteenstaande sou enige verandering in die A-C-kompleks tog 'n kwantitatiewe aanduiding wees van 'n verandering in die hoeveelheid van die A-komponent. Hierdie aanname berus op die feit dat fraksie C nie-spesifieke onsuiwerhede verteenwoordig en dit word veronderstel dat daar met dieselfde noukeurig-gekontroleerde ekstraksiemetode dieselfde persentasie van C in elke ekstrak aanwesig sal wees.

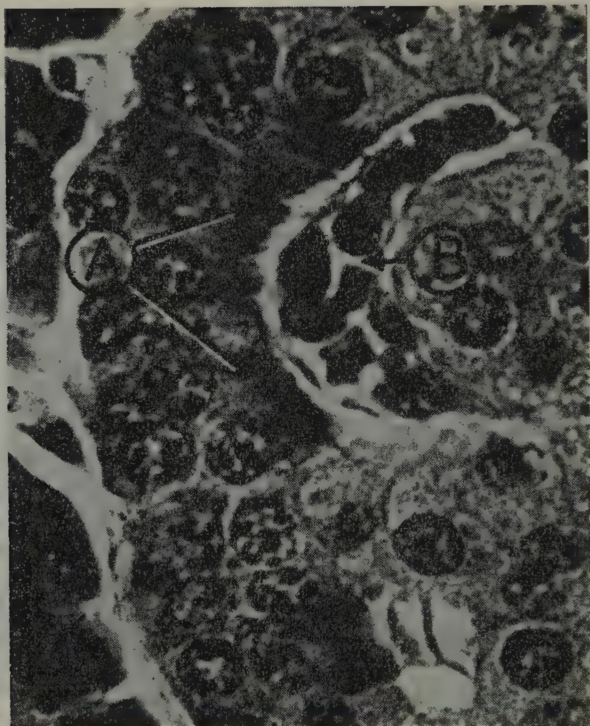
Fig. 14 toon aan dat $CoCl_2$ wel 'n baie uitgesproke invloed op die betrokke verhouding uitoefen. Reeds 30 minute ná die $CoCl_2$-inspuiting is die persentasie-verhouding aansienlik laer as die normale waarde, terwyl dit ná 2 uur 'n laagtepunt bereik. Hierna tree daar weer 'n geleidelike toename op, om 2 dae ná die inspuiting 'n waarde te bereik wat slegs ietwat laer as die normale is en ná die verloop van 'n verdere 4 dae, nog voortduur.



Figuur 1.

'n Deel van 'n eilandjie van Langerhans in die pankreas van 'n normale rot (X 1000).

A. alfa-selle.
B. beta-selle.
C. acini.
D. kapillêr.
E. bindweefselkapsel.

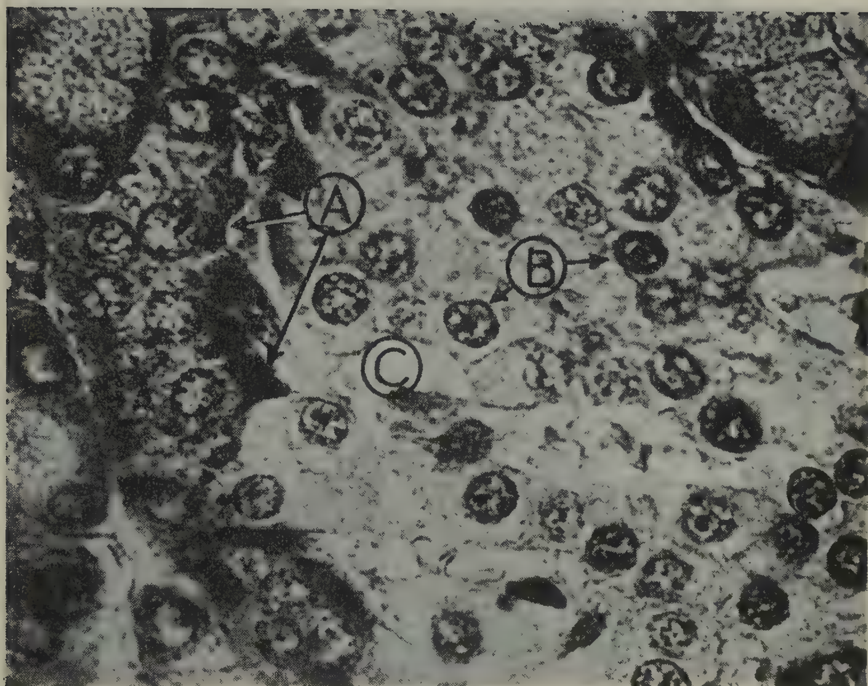


Figuur 2.

Eilandselle in 'n niasienamied-behandelde rot 10 minute na $CoCl_2$-inspuiting (X 970).

A. polarisasie in alfa-selle.

B. kapillêr.



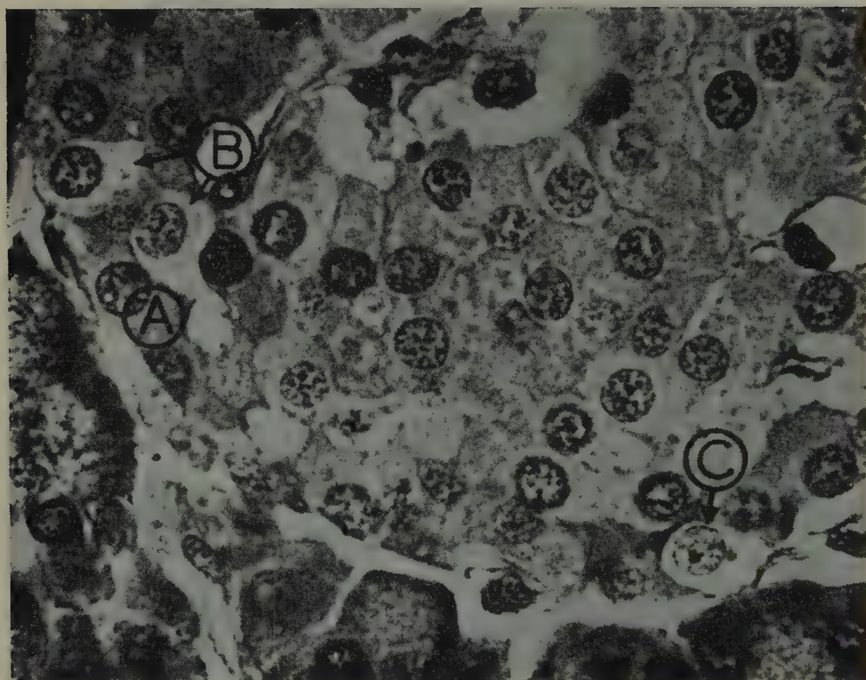
Figuur 3.

'n Eilandjie van Langerhans 27 minute na $CoCl_2$-inspuiting (X 1000).

A. alfa-selle (toon duidelike polarisasie).

B. beta-selle.

C. kapillêr.



Figuur 4.

'n Eilandjie van Langerhans een uur na $CoCl_2$-inspuiting (X 1000).

A. normale alfa-sel.

B. alfa-selle wat degranulasie vertoon.

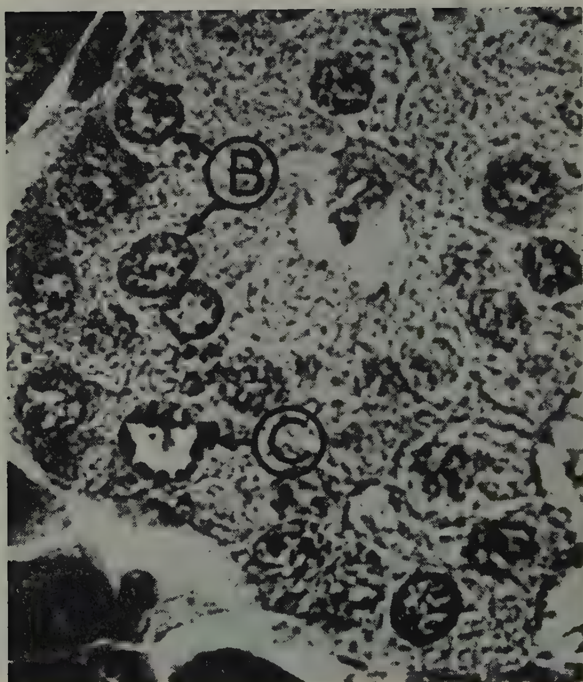
C. alfa-sel met totale vervloeiing van die sitoplasma.



Figuur 5.

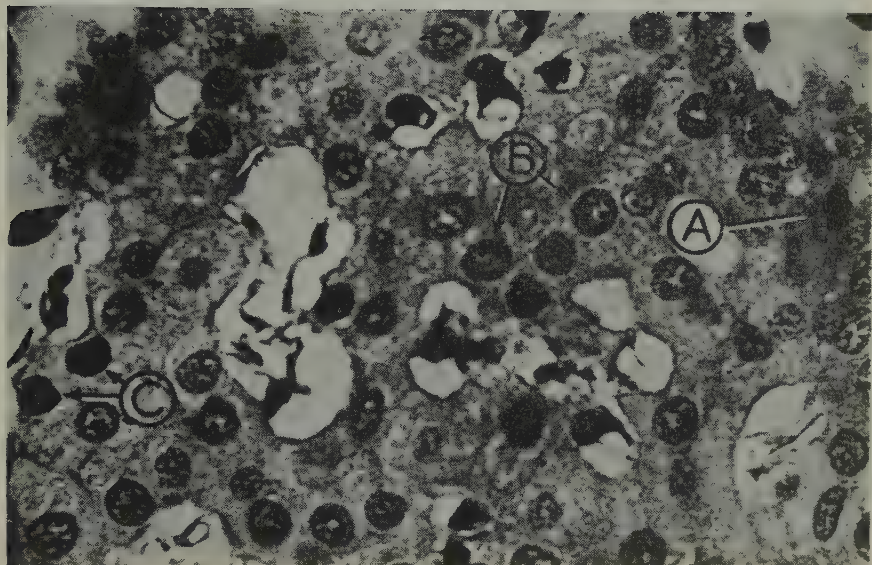
Eilandselle in 'n niasienamied-behandelde rot 4½ uur na $CoCl_2$-inspuiting (X 970).

A. hiperchromasie in alfa-sel-kerne.
B. groot alfa-sel met min granules.
C. groot beta-sel met min granules.



Figuur 6.

Eilandselle 1 dag na $CoCl_2$-inspuiting (X 1000).
B. normale beta-selle.
C. kariorrheksis van alfa-sel-kern.



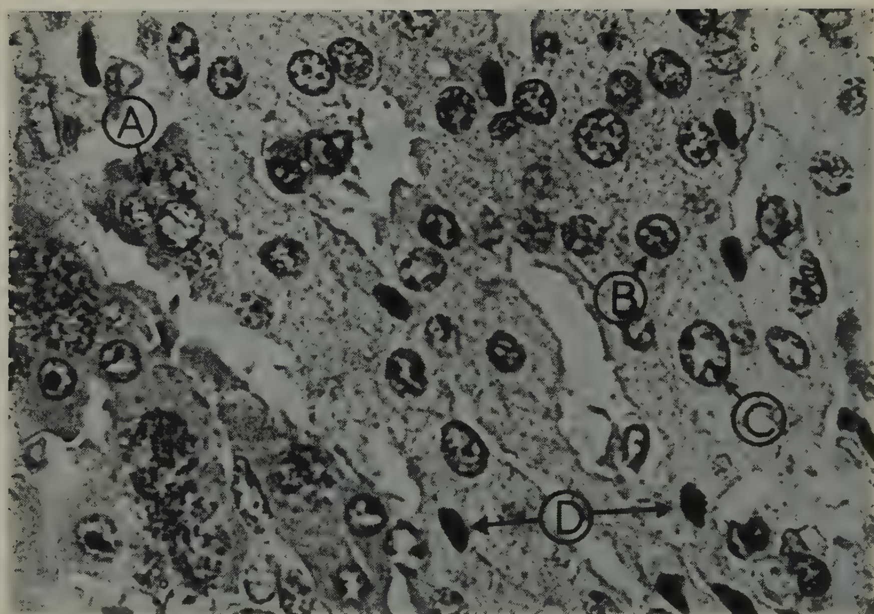
Figuur 7.

'n Eilandjie van Langerhans 4½ uur na $CoCl_2$-inspuiting (X 970).

A. alfa-sel met hiperchromatiese kern.

B. normale beta-selle.

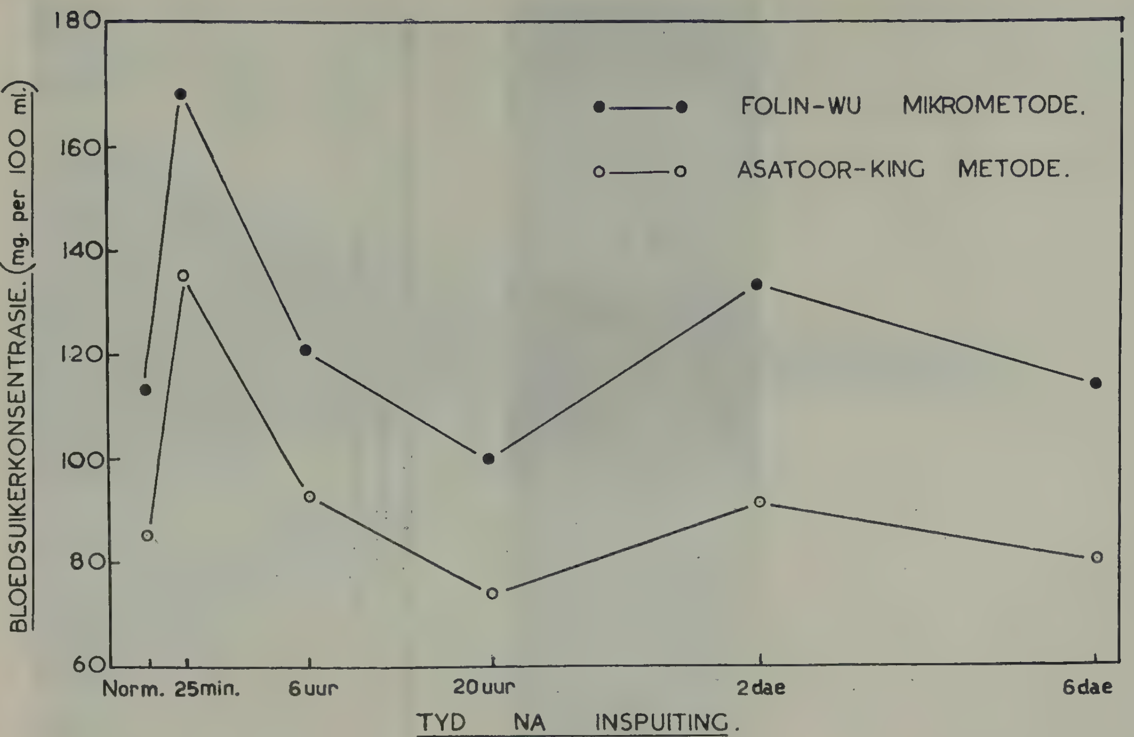
C. beta-selle met hiperchromatiese kerne.



Figuur 8.

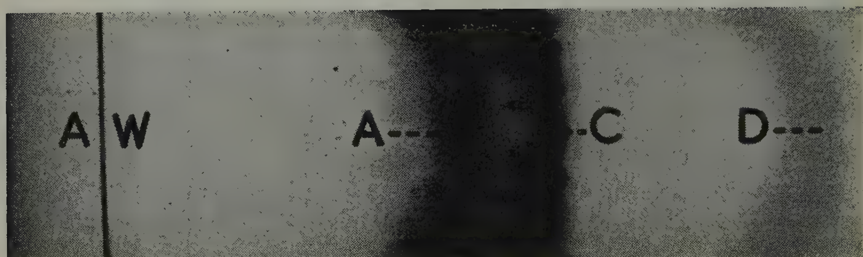
'n Deel van 'n eilandjie van Langerhans in 'n niasienamied-behandelde rot 3 dae na $CoCl_2$-inspuiting (X 1000).

A. alfa-selle.
B. normale beta-sel.
C. beta-sel met groot kern.
D. beta-selle met piknotiese kerne.



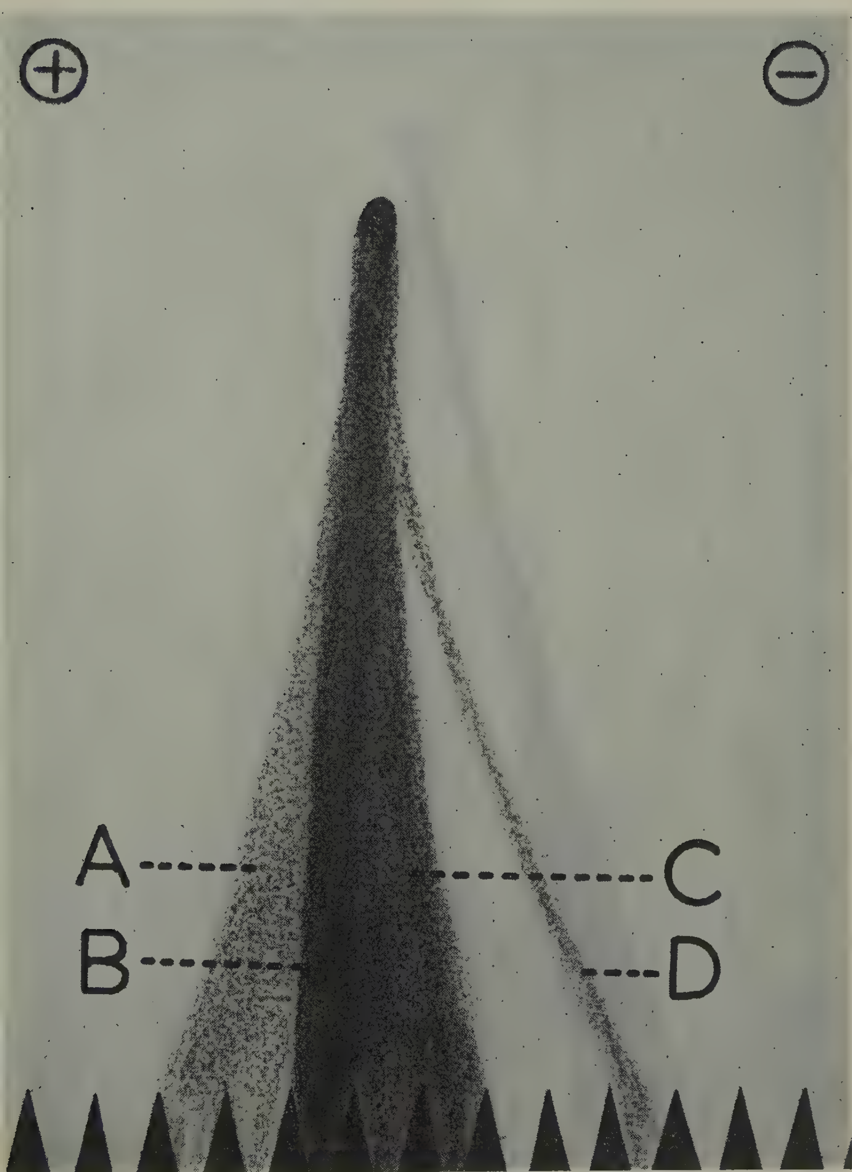
Figuur 9.

Die invloed van $CoCl_2$ op die perifere bloedsuikerkonsentrasie.



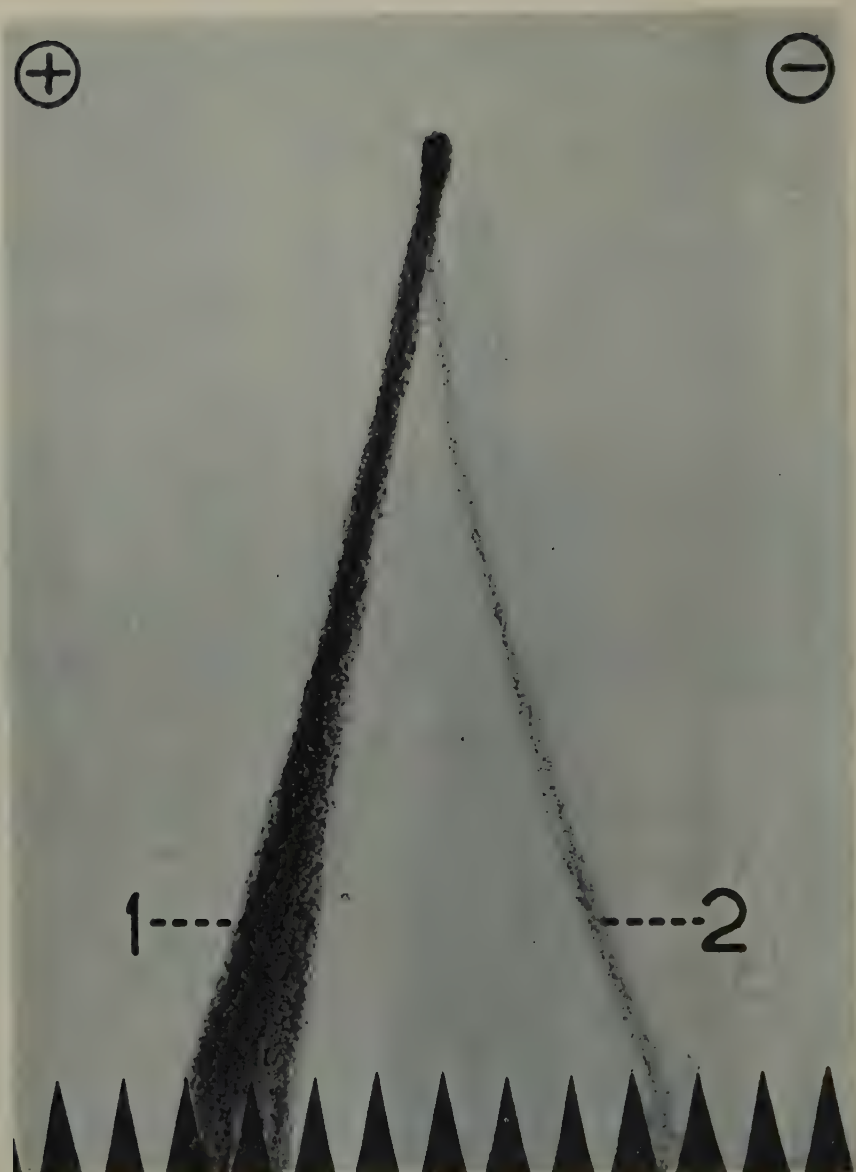
Figuur 10.

Elektroforetogram van 'n rotpankreas-ekstrak (papierstrook-elektroforese).
A, C, D. proteïenfraksies.
AW. aanwendingsplek naby anode.



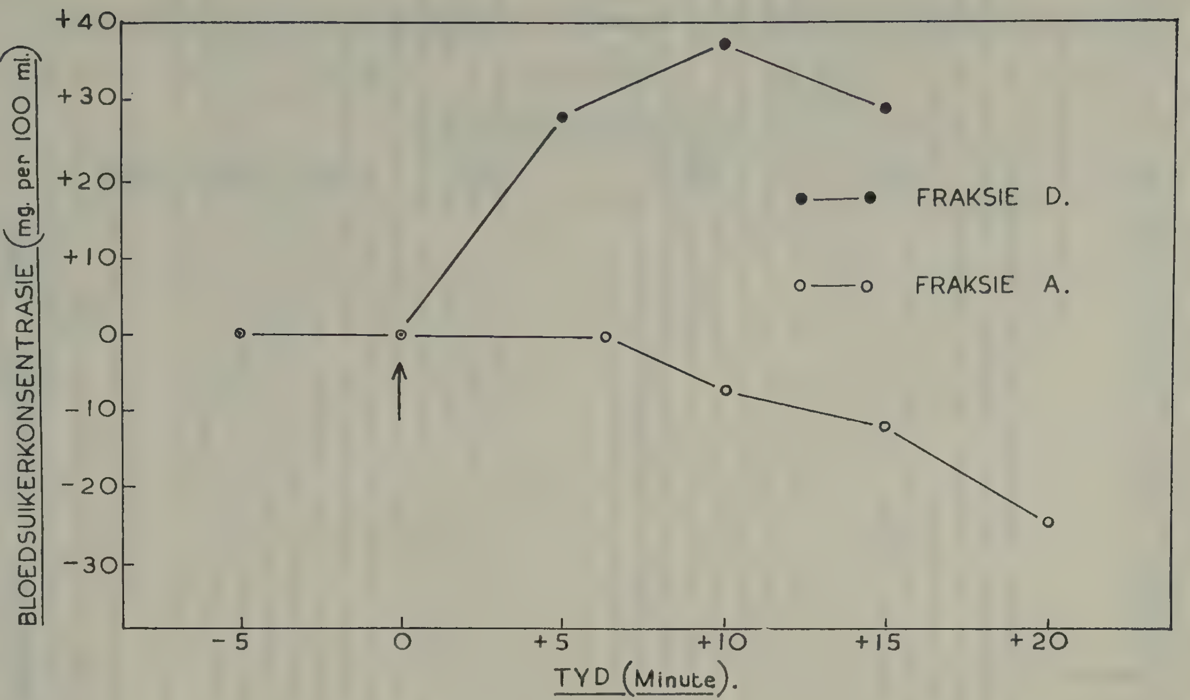
Figuur 11.

Elektroforetogram van 'n rotpankreas-ekstrak (aaneenlopende elektroforese). A, B, C, D. proteïenfraksies.



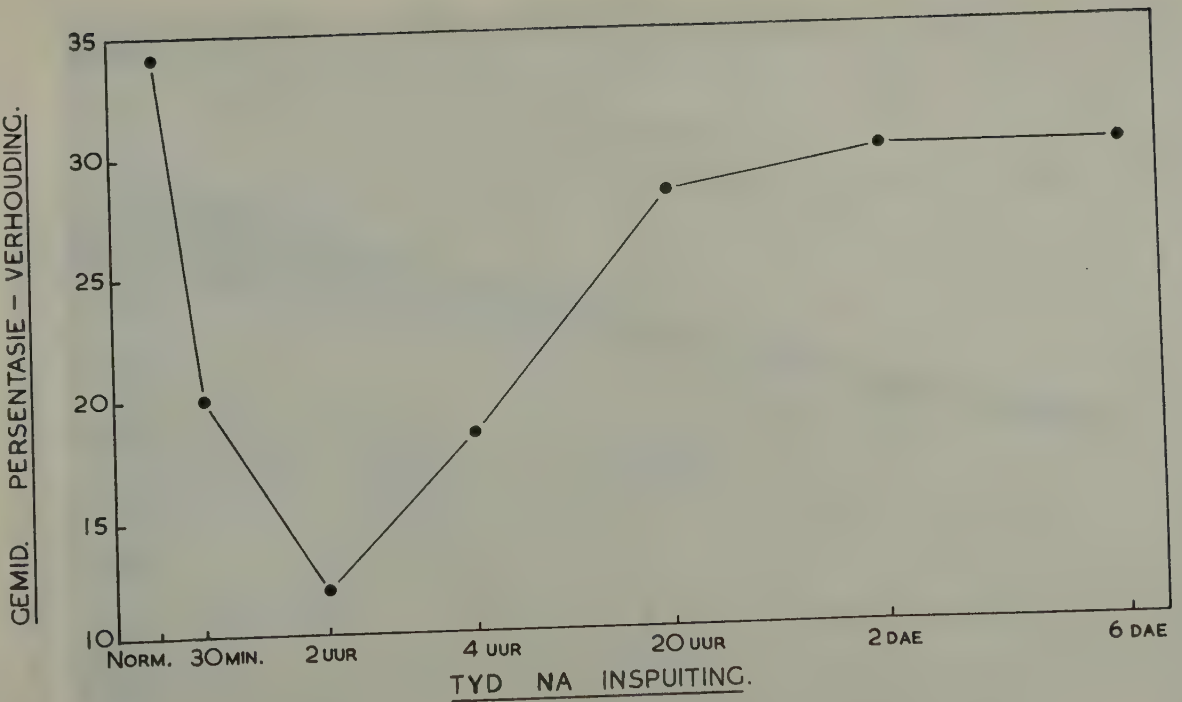
Figuur 12.

Elektroforetogram van 'n kommersiële insulien-preparaat (aaneenlopende elektroforese).
1. insulien-komponent.
2. „glukagon"-komponent.



Figuur 13.

Die farmakologiese uitwerking van fraksies A en D op die bloedsuikerkonsentrasie.



Figuur 14.

Die invloed van $CoCl_2$ op die kwantitatiewe verhouding tussen fraksie D en die A-C-kompleks.

BESPREKING

A. DIE EKSPERIMENTELE PROSEDURE

Alvorens oorgegaan word tot die interpretasie van die veranderinge wat in die liggaam optree ná $CoCl_2$-toediening, moet sekere aspekte van die eksperimentele prosedure duidelikheidshalwe eers bespreek word.

1. Die Bloedsuikerbepalings.

By 'n vergelyking van die gemiddelde kontrole-waardes wat met die twee metodes vir die bepaling van die bloedsuikerkonsentrasie verkry is, is dit opvallend dat die Folin-Wu- en die Asatoor-King-metode, waardes van 114 en 86 mg.% respektiewelik met duplikaat-bloedmonsters gegee het. Uit die literatuur blyk dit egter baie duidelik dat die spesifieke metode wat vir die bloedsuikerbepalings gebruik word, eintlik verantwoordelik gehou moet word vir die verskil in die bloedsuikerwaardes wat deur verskillende navorsers aangegee word. Corey en Britton (1937) vind byvoorbeeld 'n waarde van 104 mg.% met die Folin-Malmros-metode, terwyl Gaarenstroom (1947) 'n gemiddelde normale waarde van 74 mg.% met die Hagedorn-Jensen-metode verkry. Dit word egter algemeen aanvaar dat die metode van Hagedorn en Jensen (1936), sowel as dié van Asatoor en King (1954) meer gevoelig vir suikers en minder gevoelig vir ander reduserende stowwe in die bloed is. Daarenteen is die Folin-Wu- en Folin-Malmros-metodes weer gevoeliger vir allerlei reduserende bloedbestanddele. Hierin sou dus 'n verklaring lê vir die groot verskille in die onderskeie gemiddelde waardes.

Verder was dit ook opvallend dat die hoogste en laagste waardes van 'n bepaalde groep bloedmonsters, wat met dieselfde bepalingsmetode, op dieselfde tydstip na die $CoCl_2$-inspuiting verkry is, aansienlike verskille toon. Ter verklaring hiervoor word herinner aan die feit dat met nie-vastende rotte gewerk is en dat hul bloedsuikerkonsentrasies noodwendig moes saamhang met die hoeveelheid kos wat gevreet is, asook die tyd wat verloop het vanaf die laaste kos-inname tot die bloedonttrekking. Die gebruik om ondersoekinge aangaande die bloedsuikerkonsentrasie op vastende proefdiere uit te voer, is doelbewus nie gevolg nie. In hierdie ondersoek is daar naamlik spesifiek op die funksionele aktiwiteit van die alfa-selle gelet en volgens Weisberg en sy medewerkers (1949) sou die hiperglusemiese faktor, afkomstig uit die alfa-selle, 'n baie kleiner invloed op die bloedsuikerkonsentrasie by vastende as by nie-vastende proefdiere hê.

2. Die proteïenkomponente van pankreas-ekstrakte.

Dat kommersiële insulien-preparate, uit normale pankreasse berei, uit verskeie proteïenfraksies bestaan, is nie net deur middel van papier-elektroforese nie, maar ook papierchromatografies bewys. Só byvoorbeeld kon Berkes en Berkes (1956) en Carpenter en Hess (1956) daarin slaag om met behulp van chromatografie, drie afsonderlike fraksies in kommersiële insulienpreparate aan te toon. Carpenter en Hess kom egter tot die gevolgtrekking dat hul met 'n kunsmatige verskynsel te doen gehad het, aangesien elke fraksie by herondersoek weer drie subfraksies gegee het. Berkes en Berkes skryf dié verskynsel toe aan

die dissosiasie van die insulien-molekules. Hiervolgens sou die drie fraksies nie afsonderlike molekule-soorte in die oorspronklike insulienpreparaat verteenwoordig nie, maar slegs die dissosiasie-produkte wat tydens die chromatografie gevorm word. pH-Waardes kleiner as 2.5 of groter as 10, sowel as die aanwesigheid van fosfaat-ione, sou volgens hulle die dissosiasie bevorder, terwyl chloried-ione en rhodanied dit teenwerk. Ook Dickenson (1956) het met 'n soortgelyke verskynsel te doen gekry. Hy het naamlik gevind dat 'n vars-bereide insulienpreparaat slegs één fraksie gee, indien dit aan chromatografie by pH 3 onderwerp word. Nadat dit egter vir 'n paar dae opgeberg was, kon hy met dieselfde metodes twee duidelike fraksies onderskei.

In die huidige ondersoek is bogenoemde faktore, wat die sogenoemde dissosiasie van insulien sou beïnvloed, deeglik in aanmerking geneem. In die eerste instansie was die pH van die bufferoplossing 8.6 en tweedens was daar altyd Cl^--ione aanwesig, wat elkeen op sy beurt die dissosiasie sou teenwerk. Verder was die preparate wat in hierdie ondersoek gebruik is, betreklik vars en ewe oud.

Hoewel insulien ook reeds met behulp van chromatografie uit verskeie proteïenmengsels soos lewer- en pankreas-ekstrakte geskei (Grodsky en Tarver — 1956) kon word, is dieselfde sukses nog nie met glukagon gerapporteer nie.

Nieteenstaande die teleurstellende resultate wat verkry is met die chromatografiese ondersoek van glukagon-insulien-mengsels, kon Sutherland en sy medewerkers (1949) die hiperglusemiese faktor uit 'n amorfe insulien-preparaat met behulp van elektroforese isoleer. Ook Light en Simpson (1956) kon met elektroforese-metodes insulienpreparate in 'n insulien- en 'n glukagon-komponent skei.

3. Die farmakologiese aktiwiteit van die proteïenkomponente uit pankreas-ekstrakte.

Harfenist en Craig (1952), asook Berkes en Berkes (1956), is van mening dat al die chromatografies-verkrygde fraksies van insulienpreparate 'n hipoglusemiese uitwerking het. Daarenteen beweer Sutherland en sy medewerkers (1949) asook Light en Simpson (1956) dat hulle met behulp van elektroforese-metodes 'n hipoglusemiese, sowel as 'n hiperglusemiese komponent uit sulke preparate kon isoleer.

Genoemde meningsverskil aangaande die farmakologiese uitwerking van die verskillende fraksies sou aan verskeie faktore toegeskryf kon word. Soos gemeld, sou 'n buffermedium met 'n besondere hoë of lae pH wel dissosiasie van die insulien-molekule kon teweegbring waardeur verskeie hipoglusemiese afbraakprodukte dus gevorm kan word. Die hiperglusemiese uitwerking van die glukagon-fraksie sou ook deur ,,besoedeling" met die buffer, wat 'n hipoglusemiese uitwerking kan hê, ,,gemasker" kon word.

'n Verdere belangrike faktor sou saamhang met die spesifieke proefdier wat vir die farmakologiese ondersoek gebruik word. Bencosme en andere (1957) wys bv. daarop dat konyne vals negatiewe resultate gee. Daarenteen meen Staub, Sinn en Behrens (1955) en Bencosme et al (1957) dat katte meer sensitief is vir die hiperglusemiese uitwerking van glukagon as die meeste ander proefdiere. Ook sou vastende proefdiere nie 'n normale reaksie op H.G.F. (glukagon) toon nie (Weisberg et al — 1949). Laasgenoemde ondersoekers wys verder daarop dat pentobarbital-anestese die hiperglusemiese uitwerking van glukagon versterk.

Derhalwe is daar in die onderhawige ondersoek na die farmakologiese uitwerking van die fraksies, van nie-vastende katte, onder pentobarbital-anestese, gebruik gemaak. Uit die resultate blyk dit dan ook duidelik dat onder genoemde omstandighede die glusemiese werking van twee proteïenkomponente uit pankreas-ekstrakte geïllustreer kon word.

Aangesien die vena pancreatico-duodenalis tydens hierdie eksperiment afgebind was, moet die verandering in die bloedsuikerkonsentrasie ná die inspuiting van elke komponent, beskou word as 'n kwantitatiewe aanduiding van die glusemiese krag van die betrokke preparaat. Deur hierdie chirurgiese ingryping is daar naamlik verhoed dat enige addisionele hoeveelhede van die glusemiese faktore uit die pankreas die lewer bereik en die farmakologiese uitwerking van die ingespuite preparaat „masker" of versterk.

4. Die kwantitatiewe bepaling van die proteïenkomponente uit pankreas-ekstrakte.

Die metode vir die kwantitatiewe bepaling van die verskillende elektroforese-fraksies, soos aangewend in Eksperiment 4, berus op die bevinding van Grodsky en Tarver (1956), naamlik dat daar 'n direkte eweredigheid bestaan tussen die hoeveelheid gedenatureerde proteïen op die papier en die hoeveelheid kleurstof wat daardeur opgeneem word. In aansluiting hierby blyk dit uit die werk van Light en Simpson (1956b), asook dié van Fenton (1959) dat dié lineêre verwantskap tussen die hoeveelheid proteïen op die papier en die hoeveelheid geadsorbeerde kleurstof ook vir 'n hormonale proteïen soos insulien geld. Alhoewel Cremer en Tiselius (1950) 'n verskil in die affiniteit van proteïene soos serumalbumien en -globulien vir broomfenolblou kon aantoon, is Griffiths (1953) van mening dat hierdie affiniteitsverskille by verskillende proteïene só gering is dat dit vir alle praktiese doeleindes verontagsaam kan word. Verskeie outeurs, o.a. Durrum (1955), is dit egter eens dat ondoeltreffende denaturasie van die proteïenfraksies, swak kleurstof-adsorbsie tot gevolg het. Ook in die huidige ondersoek is bevind dat deeglike denaturasie 'n belangrike voorvereiste is vir die noukeurige en doeltreffende kwantitatiewe bepaling van die onderskeie fraksies.

B. DIE INTERPRETASIE VAN DIE UITWERKING VAN $CoCl_2$ OP DIE PROEFDIER

Die hoofdoel van hierdie ondersoek was om vas te stel of kunsmatige verandering in die sekretoriese aktiwiteit van die alfa-selle in die pankreas-eilandweefsel enige versteuring van die normale koolhidraatmetabolisme tot gevolg sou hê. Afwykinge in die koolhidraatmetabolisme is in terme van veranderinge in die bloedsuikerspieël gemeet. Sodanige versteuring sou dus 'n aanduiding wees van die rol van die betrokke selsoort in dié besondere afdeling van die intermediêre metabolisme.

Alhoewel $CoCl_2$ na bewering suksesvol aangewend is vir vernietiging van die alfa-selle van die marmotjie, meen Bencosme et al (1957) dat hierdie uitwerking nie by die rot verkry word nie. Die resultate van die huidige ondersoek toon egter baie duidelik dat intraperitoneale inspuiting van $CoCl_2$-oplossing wel 'n histologies-waarneem-

bare uitwerking op die eilandweefsel van die rot het. In ooreenstemming met die bevindings van Avezzù en Luise (1951), Van Campenhout et al (1954), Bencosme en Frei (1956) en Fodden (1953) is die sitopatologiese veranderinge wat in die alfa-selle optree, hoofsaaklik in die aard van degranulasie en hidropiese vakuolisasie.

Die histologiese veranderinge wat in die beta-selle gedurende die derde en vierde fases waargeneem is, sou aan uitputting van die selle toegeskryf kan word. Dit sou teweeggebring word deur die primêre hiperglusemie wat op $CoCl_2$-inspuiting volg. Dat 'n langdurige verhoging van die bloedsuikerspieël uitputtingsatrofie van die beta-selle teweegbring, is deur verskeie ondersoekers eksperimenteel bewys (Esterhuizen, 1948; Dohan en Lukens, 1948; e.a.). Of 'n tydelike hiperglusemie van slegs enkele ure ook uitputtingsatrofie van die selle tot gevolg kan hê, is nie so 'n uitgemaakte saak nie. Evan (1933) meen bv. dat een enkele intraperitoneale inspuiting van glukose geen nadelige uitwerking op die eilandweefsel het nie. In teenstelling hiermee vind Gomori en sy medewerkers (1939) 'n opvallende vermindering van die granule-inhoud van die beta-selle tussen 3—4 uur na intraveneuse inspuiting van glukose.

Terwyl die degranulasie van die beta-selle dus moontlik aan die primêre hiperglusemie gewyt kan word, is dit onwaarskynlik dat die kern-veranderinge (hiperchromasie en piknose) ook aan dieselfde meganisme toegeskryf sou kon word. So ook is die presiese meganisme wat verantwoordelik is vir die verandering in die alfa-selkerne, nie duidelik nie. In albei gevalle volg die kern-veranderinge op degranulasie van die selle, sodat dit moontlik as 'n sekondêre verskynsel, waarby die $CoCl_2$ direk betrokke mag wees, beskou kan word. Uit die werk van Griffith et al. (1942) wil dit voorkom dat Co^{++} die oksidasie-reduksie-potensiaal van die sel kan beïnvloed deur bv. met glutatioon te verbind. Sodanige versteuring van die oksidasie-meganisme sou moontlik aanleiding kon gee tot nekrobiose met die kenmerkende kern-veranderinge. Vanselfsprekend sal die mees aktiewe selle die meeste beïnvloed word. In die onderhawige geval sal die kerne van die alfa-selle dus eerste geaffekteer raak en die beta-selkerne eers later, d.w.s. wanneer hulle sekresie-meganisme deur die primêre hiperglusemie gestimuleer word.

Die degranulasie van die alfa-selle sou aan 'n uitstoting van die alfa-sel-sekreet (glukagon) in die sirkulerende bloed toegeskryf kan word. Alhoewel daar tot dusver nog nie afdoende bewys is dat hierdie granules wel die sekreet, of altans 'n onmiddellike voorloper van die sekreet is nie, sou so 'n sienswyse tog na analogie van die toestand by die beta-sel-granules, aanvaar kan word. Hartroft en Wrenshall (1953) kon naamlik 'n besondere korrelasie tussen die beta-sel-granules en die insulien-inhoud van die beta-selle aantoon.

Hiervolgens sou degranulasie van die alfa-selle dus opgevolg word deur 'n verandering in die bloedsuikerspieël. Sodanige veranderinge is dan ook waargeneem ná beskadiging van die betrokke selle met $CoCl_2$ (Frank et al — 1957). Ook in die huidige ondersoek kon uitgesproke veranderinge, te wete 'n trifasiese bloedsuikerrespons, ná $CoCl_2$-toediening aangetoon word. Dit blyk ook verder dat daar 'n noue korrelasie bestaan tussen die histologiese beeld van die eilandweefsel en die trifasiese bloedsuikerrespons, ná $CoCl_2$-behandeling.

Aangesien geen eenstemmigheid nog in die literatuur bereik is oor die spesifieke invloed van $CoCl_2$ op die bloedsuikerkonsentrasie

nie, volg hier kortliks 'n kritiese ontleding van elke fase van die bloedsuikerrespons soos verkry in hierdie ondersoek, tesame met 'n interpretasie van die veranderinge in die glusemiese-faktor-inhoud van die eilandweefsel:

1. Die primêre hiperglusemiese fase:

Verskeie navorsers het 'n verbygaande hiperglusemie waargeneem ná beskadiging van die alfa-selle met $CoCl_2$ (Weisberg en Kaplan — 1953), IPTD (Von Holt et al — 1955) en Cintalien A (Davis — 1952). Ter verklaring van hierdie fase meen Von Holt en sy medewerkers dat dit nie 'n direkte gevolg van die alfa-sel-beskadiging is nie, maar dat dit eerder aan 'n verhoogde sekresie van adrenalien deur die byniermedulla toegeskryf moet word, aangesien dié fase nie by bynierlose proefdiere optree nie. Alhoewel hulle ook voorts beweer dat hierdie fase nooit optree na Sintalien A-behandeling nie, het Davis (1952), Fodden (1953) en andere tog die teenoorgestelde bewys. Verder meen Lazarus, Goldner en Volk (1953) dat dié betrokke fase nie deur die vinnige vrystelling van 'n hiperglusemiese faktor uit die pankreas veroorsaak kan word nie, aangesien dit ook by pankreaslose proefdiere optree. Hierdie sienswyse word ook deur Goldner en andere (1952) gehuldig op grond van hulle bevinding dat 'n hiperglusemiese fase telkens ná $CoCl_2$-toediening optree, al word die inspuitings so gou as een uur na mekaar herhaal. Hierdie outeurs is dus van mening dat die hiperglusemie ná die tweede inspuiting, nie aan HGF-vrystelling toegeskryf kan word nie, aangesien die beskadigde alfa-selle dan, so beweer hulle, geen HGF meer sou bevat nie. Hierdie bewering word egter totaal omvergewerp deur ons bevinding dat die granule-inhoud van sommige alfa-selle, een uur ná die inspuiting heeltemal normaal voorkom, sodat 'n tweede inspuiting nog wel 'n verhoogde vrystelling van 'n hiperglusemiese faktor sou kon bewerkstellig.

Dat verhoogde adrenaliensekresie 'n belangrike faktor in hierdie verband is, kan geensins betwyfel word nie, alhoewel dit nogtans nie as die enigste faktor aanvaar moet word nie. So byvoorbeeld dui die bevindings van Eksperiment 4 daarop dat toediening van $CoCl_2$ opgevolg word deur 'n aansienlike verlaging van die relatiewe hoeveelheid van die hiperglusemiese faktor in die pankreas. Aangesien daar hoegenaamd geen rede bestaan om te vermoed dat $CoCl_2$ hierdie faktor vernietig nie, kan slegs aangeneem word dat dit onder die invloed van $CoCl_2$ in die bloedstroom uitgestoot, na die lewer vervoer word en die glikogenolise-proses aldaar versnel. Hierdie sienswyse word voorts ondersteun deur die stelling van Weisberg en Kaplan (1953), naamlik dat alfa-selbeskadiging die vrystelling van opgebergde glukagon teweegbring.

Verder is dit ook veelseggend dat die polarisasie en degranulasie van die alfa-selle ná $CoCl_2$-toediening, saamval met die verlaging van die hoeveelheid hiperglusemiese faktor wat 2 uur ná die inspuiting uit die pankreas geïsoleer kan word. Die enigste logiese gevolgtrekking wat hieruit gemaak sou kon word, is dat die alfa-selle die bron is van 'n hiperglusemiese faktor en dat $CoCl_2$ die vrystelling daarvan bewerkstellig.

2. Die hipoglusemiese fase:

Terwyl verskeie navorsers (Davis — 1952; Von Holt et al — 1955) 'n uitgesproke hipoglusemie tussen vier en sestien uur ná vernietiging van

die alfa-selle met Sintalien A kon waarneem, meen Volk en sy medewerkers (1953) dat geen hipoglusemie op enige tydstip na $CoCl_2$-toediening, onderskei kan word nie. Uit die onderhawige ondersoek blyk dit dat daar wel 'n *relatiewe* hipoglusemiese fase, twintig uur na die inspuiting opgetree het. Inderwaarheid kon selfs 'n absolute hipoglusemie by sommige rotte op hierdie tydstip waargeneem word. Terwyl Crentzfeldt en Tecklenborg (1955) van mening is dat daar geen fisiologiese korrelasie tussen hierdie fase en die alfa-sel-beskadiging deur Sintalien A of IPTD bestaan nie, is Fodden (1953) daarvan oortuig dat die graad van hipoglusemie ooreenstem met die mate waarin die alfa-selle beskadig is. Dit wil sê 'n tekort aan die alfa-sel-sekreet sou aanleiding gee tot 'n hipoglusemiese toestand. Hierdie sienswyse is alleen aanvaarbaar as dit gesien word in die lig van die bewering van Fodden en Read (1954), naamlik dat die bloedsuikerspieël gesien moet word as die resultant van 'n gebalanseerde sekresie van insulien en glukagon. Hiervolgens sou die alfa-sel-beskadiging die sekresie van die hiperglusemiese faktor tot só 'n mate beïnvloed, dat die glukagon-insulien-balans in die bloedstroom versteur word en insulien-hipoglusemie noodwendig intree.

Fodden en Read (1954) meen egter dat $CoCl_2$ nie die sekresie-aktiwiteit van die alfa-selle noemenswaardig benadeel nie, maar dat dit slegs die vrystelling van die sekreet in die bloedstroom teenwerk, met gevolglike intrasellulêre ophoping. Hierteenoor kon Bencosme en Frei (1956) egter waarneem dat pankreas-ekstrakte van $CoCl_2$-behandelde proefdiere nie uitgesproke hiperglusemie-verwekkend is nie, waaruit afgelei moet word dat $CoCl_2$ wel die sekresie-aktiwiteit van die alfa-selle onderdruk. In die huidige ondersoek is dit gevind dat die verhouding van die glusemiese faktore in die pankreas, 2 uur ná die $CoCl_2$-inspuiting 'n laagtepunt bereik, terwyl die hipoglusemiese fase eers 20 uur na sodanige inspuiting 'n minimum bereik. Hieruit wil dit dus voorkom of die hipoglusemiese fase nie uitsluitlik aan 'n verlaagde sekresie van die hiperglusemiese faktor toegeskryf kan word nie.

Dit moet egter beklemtoon word dat die betrokke persentasie-verhouding nie alleen 'n vermindering sal toon as gevolg van verlaagde sekresie van die hiperglusemiese faktor nie, maar ook as gevolg van verhoogde insulien-sekresie, en dat enige sodanige versteuring noodwendig 'n hipoglusemiese toestand in die hand sal werk. Dit sou verklaar waarom navorsers soos Davis (1952) en Beekman (1956) selfs hipoglusemiese stuiptrekkings en die dood by hulle proefdiere, ná alfa-sel-beskadiging met Sintalien A, verkry het. In hierdie verband beweer Foà (1949), Costa (1956) en andere dan ook dat glukagon-hiperglusemie die beta-selle tot verhoogde insulien-sekresie prikkel. Hiervolgens sou dan ook verwag kon word dat die primêre hiperglusemiese fase opgevolg sou word deur 'n insulien-geïnduseerde hipoglusemiese fase.

Hierdie relatiewe hipoglusemiese fase moet dus hoofsaaklik toegeskryf word aan 'n kompensatoriese verhoging van die insulien-sekresie, hoewel 'n verlaagde afskeiding van die hiperglusemiese faktor ook 'n ondergeskikte rol mag speel.

3. Die sekondêre hiperglusemiese fase:

Die derde fase, wat op die tweede dag na die $CoCl_2$-toediening waargeneem is, sou aan verskillende faktore toegeskryf kan word. Dit is in Eksperiment 4 vasgestel dat die kwantitatiewe verhouding van die glusemiese faktore in die pankreas op hierdie stadium tot die

normale waarde teruggekeer het, sodat dié fase nie aan 'n wanverhouding van hierdie faktore *(in die pankreas)* toegeskryf kan word nie. Dit is egter nie bekend of die verhouding van hierdie sekrete *in die bloedstroom* ook die normale perke bereik het nie. 'n Verhoogde afskeiding van die hiperglusemiese faktor in die bloedstroom sou egter wel as 'n oorsaaklike faktor vir hierdie hiperglusemiese fase beskou kan word, veral as in aanmerking geneem word dat die voorafgaande insulien-geïnduseerde hipoglusemiese fase, heel moontlik sekondêre verhoogde aktiwiteit van die oorblywende onbeskadigde alfa-selle kan ontlok (Foà et al — 1957).

Verder sou die sekondêre beskadiging van die beta-selle en die daaropvolgende versteuring van die funksionele ewewig tussen die alfa- en beta-selle onder andere die oorsaak van dié betrokke fase kon wees.

In die derde instansie sou 'n bykomstige verklaring vir hierdie fase gesoek kon word in die verhoogde afskeiding van kortikoïede deur die bynierkorteks. Foà (1949), Costa (1956) en andere meen dat glukagon die bynierkorteks tot verhoogde aktiwiteit prikkel. As gevolg van die hiperglusemiese uitwerking van die vrygestelde kortikoïede sou die voorafgaande hipoglusemiese fase dan teengewerk of as 't ware kortgesny word met gevolglike styging van die bloedsuikerkonsentrasie tot 'n hiperglusemiese waarde.

Dit blyk dus dat die sekondêre hiperglusemiese fase moontlik toegskryf kan word aan 'n versteuring van die funksionele ewewig tussen die alfa- en beta-selle, asook 'n verhoogde sekresie van kortikoïedes. Daar dien op gelet te word dat bogenoemde versteuring presies die teenoorgestelde is van dié wat optree tydens die relatiewe hipoglusemiese fase.

Anders as met alloksaan is die beskadigende uitwerking van $CoCl_2$ nie permanent nie, sodat die eilandweefsel weer vinnig regenereer. Dit is gevolglig nie onverwags dat die bloedglukosekonsentrasie reeds na 6 dae feitlik weer die normale, pre-eksperimentele waarde bereik het nie.

Hoewel navorsers soos Volk, Lazarus en Goldner (1953) van mening is dat die alfa-selle geen noemenswaardige rol in die bloedsuikerregulering speel nie, wil dit uit die voorgaande bespreking voorkom of hierdie mening nie geregverdig is nie. So byvoorbeeld blyk dit dat daar 'n noukeurige korrelasie bestaan tussen die fisiologiese toestand van die alfa-selle en die bloedsuikerspieël. Dit is verder ook hoogs waarskynlik dat die hiperglusemiese glikogenolitiese sekreet van dié selle, saam met insulien uit die beta-selle, wederkerig verantwoordelik gehou moet word vir die instandhouding van 'n konstante bloedsuikerspieël.

OPSOMMING

Hierdie ondersoek is onderneem ten einde meer lig te werp op die funksie van die alfa-selle van die eilandweefsel, veral ten opsigte van die koolhidraat-metabolisme. Dit handel oor die invloed van 'n alfa-sel-beskadigende verbinding, $CoCl_2$, op (i) die histologiese voorkoms van die eilandweefsel, (ii) die perifere bloedglukosekonsentrasie en (iii) die relatiewe, kwantitatiewe verhouding tussen die glusemiese komponente van pankreas-ekstrakte. Besondere aandag is egter geskenk aan die hiperglusemiese faktor, wat na bewering uit die alfa-selle van die eilandweefsel afkomstig is. Die mate waartoe die bloedsuikerkon-

sentrasie ná beskadiging van dié selsoort met $CoCl_2$ wissel, is geneem as 'n aanduiding van die belang van hierdie selle in die koolhidraatmetabolisme.

Verskeie papier-elektroforetiese metodes is aangewend om die samestelling van kommersiële insulien en vars-bereide pankreasekstrakte vas te stel.

Die belangrikste bevindings kan as volg saamgevat word:

1. By 'n papier-elektroforetiese ondersoek van 'n vars-bereide, ongesuiwerde pankreasekstrak, blyk dit dat sulke ekstrakte uit drie proteïenfraksies, waarvan twee glusemiese faktore is, bestaan. Een van laasgenoemde fraksies veroorsaak hiperglusemie, terwyl die tweede hipoglusemie teweegbring wanneer dit by normale proefdiere (katte) ingespuit word.

2. Die toediening van $CoCl_2$ (25 mg./Kg.) by albino-rotte veroorsaak

(i) tydelike degranulasie en hidropiese degenerasie van sommige van die alfa-selle, asook uitputtingsatrofie van sommige van die betaselle in die eilandweefsel;

(ii) 'n trifasiese bloedsuikerverandering, te wete 'n primêre hiperglusemie, 'n hipoglusemie en 'n sekondêre hiperglusemie;

(iii) versteuringe in die normale kwantitatiewe verhouding tussen die glusemiese faktore in die eilandweefsel.

3. Daar bestaan 'n positiewe korrelasie tussen: (i) die histologiese veranderinge in die eilandweefsel, (ii) die veranderinge in die kwantitatiewe verhouding tussen die glusemiese faktore in die pankreas en, (iii) die trifasiese verandering van die bloedsuikerspieël ná die toediening van $CoCl_2$. Hieruit word afgelei dat die alfa-selle van die eilandweefsel na alle waarskynlikheid 'n belangrike rol in die normale koolhidraatmetabolisme speel.

SUMMARY

The present investigation was undertaken to elucidate the conflicting reports concerning the function of the alpha cells of the pancreatic islet tissue in the regulation of carbohydrate metabolism.

The influence of an alpha cell-damaging agent, $CoCl_2$, was investigated on (i) the histology of the islet tissue, (ii) the blood sugar concentration, and (iii) the relative, quantitative relationship (ratio) between the glycaemic protein components in the islet tissue. Special attention was given to a hyperglycaemic factor, probably secreted by the alpha cells.

The variations in the blood sugar concentration of experimental animals after administration of $CoCl_2$, was taken as an indication of the important role of the alpha cells in carbohydrate metabolism.

Isolation of the glycaemic factors from pancreatic extracts and determination of their ratio were carried out by means of paper electrophoresis.

The following results were obtained:

1. It can be shown by means of paper electrophoresis that a freshly prepared, unrefined pancreatic extract comprises three protein components, only two of which cause blood sugar changes when administered intravenously to normal experimental animals (cats). One of these gives rise to hyperglycaemia, while the other initiated a hypoglycaemic phase.

2. The administration of $CoCl_2$ (25 mg./Kg.) to albino rats causes:

(i) transient degranulation and hydropic degeneration of some of the alpha cells, as well as "exhaustion atrophy" of certain beta cells in the islet tissue;

(ii) a triphasic blood sugar response, which consists of an initial hyperglycaemia, followed by a transient hypoglycaemia and a final hyperglycaemia;

(iii) a disturbance of the normal quantitative relationship between the glycaemic factors in the islet tissue.

3. After administration of $CoCl_2$ a distinct correlation was found between: (i) the histological changes in the islet tissue, (ii) the changes in the hyperglycaemic factor: insulin-ratio in the pancreatic islet tissue, and (iii) the triphasic changes in the blood sugar concentration.

These observations probably indicate the existence of an important regulatory function in respect of normal carbohydrate metabolism on the part of the alpha cells of the pancreatic islet tissue.

LITERATUURLYS

Agid, R. en Mialhe, P. 1957. Glycogen stores in glucagon-treated animals. C.R. Acad. Sci., Paris, *244*: 668.

Asatoor, A. M. en King, E. J. 1954. Simplified colorimetric blood sugar method. Biochem. J., *56*: xliv.

Avezzù, G. en Luise, R. 1951. Cobaltous chloride and the pancreatic alpha cells. Boll. Soc. ital. Biol. sper., *27*: 1515.

Beekman, B. E. 1956. The effect of Synthalin-A on blood sugar and pancreatic alpha islet cells of the fowl. Endocrin., *59*: 708.

Bencosme, S. A. en Frei, J. 1956. Relationship of glucagon to alpha cell of the pancreas. Proc. Soc. exper. Biol. Med., N.Y., *91*: 589.

Bencosme, S. A., Mariz, S. en Frei, J. 1957. Further studies on the relationship of glucagon to the alpha cell of the pancreas. Canad. J. Biochem. Phys., *35*: 1197.

Berkes, P. en Berkes, I. 1956. Paper chromatography of insulin. Biochem. Z., *328*: 361.

Berthet, J., Jacques, P., Hers, H. G. en De Duve, C. 1956. Influence of insulin and glucagon on synthesis of liver glycogen. Biochim. biophys. Acta., *20*: 190.

Best, C. H., Haist, R. E. en Ridout, J. H. 1939. Diet and the insulin content of pancreas. J. Physiol., *97*: 107.

Bürger, M. en Kramer, H. 1929. On glucagon. Ztschr. f.d. ges. exp. Med., *69*: 57 .

Cahill, G. F. (Jun.), Zothe, S. en Earle, A. S. 1957. In vivo effects of glucagon on hepatic glycogen, phosphorylase and glucose-6-phosphatase. Endocrin., *60*: 265.

Carpenter, F. H. en Hess, G. P. 1956. The theory and use of elution analysis in the partition column chromatography of insulin between 2-butanol and dichloroacetic acid, hydrochloric acid solvent systems. J. Amer. chem. Soc., *78*: 3351.

Cavellaro, C. 1953. On Glucagon. Rev. Canad. Biol., *12*: 509.

Corey, E. L. en Britton, S. W. 1937. Carbohydrate metabolism of hypophysectomised and hypophyso-adrenalectomized rats. Amer. J. Physiol., *118*: 15.

Costa, E., Galansino, G. en Foà, P. P. 1956. Glycogen stores in glucagon-treated rats. 1. Time factors. Proc. Soc. exper. Biol. Med., N.Y. *91*: 308

Cremer, H. D. en Tiselius, A. 1950. Paper chromatography and paper electrophoresis — Block, R. J., Durrum, E. L. and Zweig, G. — Acad. Press Inc., Publishers, New York Pp. 392.

Crentzfeldt, W. en Tecklenborg, E. 1955. The alpha cells of the islets of Langerhans and the action of glucagon. Path. Pharmak., *227*: 23.

Davis, J. C. 1952. Hydropic degeneration of alpha cells of pancreatic islets produced by Synthalin A. J. Path. Bact., *64*: 575.

Dickenson, W. 1956. Chromatography of insulin on calcium phosphate columns. Nature, Lond., *178*: 994.

Dohan, F. C. en Lukens, F. D. W. 1948. Experimental diabetes produced by the administration of glucose. Endocrinol., *42*: 244.

Dunn, J. S. en McLetchie, N. G. B. 1943. Experimental alloxan diabetes in the rat. Lancet, *245*: 384.

Durrum, E. L. 1950. A microelectrophoretic and microionophoretic technique. J. Amer. chem. Soc., *72*: 2943.

Durrum, E. L. 1955. Paper chromatography and paper electrophoresis — Block, R. J., Durrum, E. L. and Zweig, G. — Acad. Press Inc., Publishers, New York.

Esterhuizen, A. C. 1948. Die histologiese veranderinge in die pankreas-eilandweefsel tydens alloksaan-diabetes en eksperimentele verhoging van die bloedsuikerspieël. M.Sc.-skripsie, Univ. van Stellenbosch.

Esterhuizen, A. C. 1959. Ondersoekinge oor die morfologie, histogenese en fisiologie van die eilandweefsel van die pankreas. — D.Sc.-skripsie, Univ. van Stellenbosch.

Evans, C. 1933. Experimental hyperglycemia and the histology of the islet tissue. J. Physiol., 77: 189.

Fenton, E. L. 1959. A method for the assay of insulin by paper chromatography. Biochem. J., *71*: 507.

Fisher, N. F. 1923. 1. Preparation of insulin. Amer. J. Physiol., *67*: 57.

Foà, P. P., Galansino, G. en Pozza, G. 1957. Glucagon, a second pancreatic hormone. Rec. Progr. Horm. Res., XIII: 473.

Foà, P. P., Weinstein, H. R. en Smith, J. A. 1949. Secretion of insulin and of a hyperglycemic substance studied by means of pancreatic-femoral cross-circulation experiments. Amer. J. Physiol., *157*: 197.

Fodden, J. H. 1953. Enterochromaffin and pancreatic alpha cells: a comparison. Amer. J. Clin. Path., *23*: 994.

Fodden, J. H. en Read, W. O. 1954. The activity of extracted pancreatic hyperglycemic-glycogenolytic factor after cobaltous chloride and Synthalin A. Endocrin., *54*: 303.

Frank, C., Lamarche, J. en Kocarev, R. 1957. Precocious hyperglycemia provoked by administration of $CoCl_2$ in the guinea pig. C.R. Acad. Sci., Paris, *245*: 1165.

Gaarenstroom, J. H. 1947. On the induction of diabetes by means of alloxan. J. Endocrin., *5*: 103.

Goldner, M. G., Volk, B. W. en Lazarus, S. S. 1952. The alpha cells and $CoCl_2$. Metab., *1*: 544.

Gomori, G. 1939. Experimental intravenous glucose and the beta cells. Anat. Rec., *74*: 439.

Gonzalez, J. M. 1952. Pathogenesis of diabetes mellitus. Rev. clin. esp., *37*: 365.

Griffith, W. H., Paveck, P. L. en Mulford, D. J. 1942. The Co-ion and the living cell. J. Nutrition, *23*: 603.

Griffiths, L. I. 1953. Paper chromatography and paper electrophoresis — Block, R. J., Durrum, E. L. and Zweig, G. — Acad. Press. Inc., Publishers, New York. Pp. 392.

Grodsky, G. en Tarver, H. 1956. Paper chromatography of insulin. Nature, Lond., *177*: 223.

Hagedorn, H. C., Jensen, B. N., Krarup, N. B. en Wodstrup, I. 1936. A colorimetric blood sugar method. J. Amer. Med. Ass., *56*: 177.

Harfenist, E. J. en Craig, L. C. 1952. Countercurrent distribution studies with insulin. J. Amer. chem. Soc., *74*: 3083.

Hartroft, W. S. en Wrenshall, G. A. 1953. The correlation between the granules and the insulin content of the beta cells of the islet tissue. Fed. Proc., *12*: 390.

Haugaard, E. S. en Haugaard, N. 1954. The effect of hyperglycemic-glycogenolytic factor on fat metabolism of liver. J. biol. Chem., *206*: 641.

Kalant, N. 1956. The influence of glucagon on glycogenesis. Arch. Biochem. Biophys., *65*: 469.

Kimball, C. P. en Murlin, J. R. 1923. Aqueous extracts of pancreas. III. Some precipitation reactions of insulin. J. biol. Chem., *58*: 337.

Laguesse, E. 1893. Diabetes mellitus and the islet tissue of Langerhans, Comp. rend. Soc. de Biol., *45*: 819.

Lazarus, S. S., Goldner, M. G. en Volk, B. W. 1952. Destruction of the alpha cells —. Metab. *2*: 513.

Light, A. en Simpson, M. V. 1956a. Biosynthesis of insulin. 1. Paper chromatographic isolation of carbon-14-labelled insulin from calf pancreas slices. Biochim. Biophys. Acta., *20*: 256.

Light, A. en Simpson, M. V. 1956b. Paper chromatography of insulin. Nature, Lond., *177*: 225.

Lukens, F. D. W. 1948. Alloxan diabetes. Physiol. Rev. *28*: 304.

Pincus, I. J. en Snedecor, J. G. 1956. A review on glucagon. Metabol., *5*: 150.

Rall, T. W., Sutherland, E. W. en Berthet, J. 1957. The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. IV. Effect of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorylase in liver homogenates. J. biol. Chem., *224*: 463.

Root, M. A. 1956. Effect of glucagon on glycogen in rats and rabbits. Endocrin., *59*: 340.

Staub, A., Sinn, L. en Behrens, O. K. 1955. Purification and crystallization of glucagon. J. biol. Chem., *214*: 619.

Sutherland, E. W. en Cori, C. F. 1951. Effect of hyperglycemic-glycogenolytic factor and epinephrine on liver phosphorylase. J. biol. Chem., *188*: 531.

Sutherland, E. W., Cori, C. F., Haynes, R. en Olsen, N. S. 1949. Purification of the hyperglycemic-glycogenolytic factor from insulin and from gastric mucosa. J. biol. Chem., *180*: 825.

Sutherland, E. W. en De Duve, C. 1948. Origin and distribution of the hyperglycemic-glycogenolytic factor of the pancreas. J. biol. Chem., *175*: 663.

van Campenhout, E. en Cornelis, G. 1951. The effects of cobaltous chloride on the pancreatic alpha cells. Comp. rend. Soc. Biol., *145*: 933.

van Campenhout, E., Cornelis, G. en Deulin, Th. 1954. Cobaltous chloride and the pancreatic alpha cells. Ann. d'Endocrinol., *15*: 89.

Vesselinovitch, S. D. en Funnell, H. S. 1954. A rapid method for filter paper electrophoresis. Canad. J. Bioch. Physiol., *32*: 567.

Volk, B. W., Lazarus, S. S. en Goldner, M. G. 1953. The alpha cells and $CoCl_2$ —. Proc. Soc. exper. Biol. Med., N.Y., *82*: 406.

von Holt, C., von Holt, L. en Kroner, B. 1955. Changes in blood sugar of adrenalectomised rats after isolated destruction of the alpha cells of the pancreas. Dtsch. med. Wschr., *80*: 648.

Weisberg, H. F., Caren, R., Huddlestun, B. en Levine, R. 1949. Effects of the hyperglycemic-glycogenolytic factor (HGF) found in insulin preparations. Amer. J. Physiol., *159*: 98.

Weisberg, H. F. en Kaplan, C. M. 1953. The alpha cells and glucagon —. Fed. Proc., *12*: 151.